Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Synchronisation von T_1- und T_2-Prospermatogonien mit Hilfe von Methotrexat und Leukovorin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hansgünter Schaumburg

1981

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0142

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Synchronisation von T_1- und T_2-Prospermatogonien mit Hilfe von Methotrexat und Leukovorin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hansgünter Schaumburg

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. med. Straßburg

Referent
gez.:
Prof. Dr. med. Hilscher

Korreferent
gez.:
Prof. Dr. med. Hofmann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methodik	4
Ergebnisse	5
Diskussion	10
Zusammenfassung	16
Literatur	17
Tabellen	20
Abbildungen	23
Figuren	25
Schema	27

Einleitung

Die Gametogenese, die Entwicklung der weiblichen und männlichen Geschlechtszellen wird nach Hilscher et al. (1974) in drei große Etappen untergliedert:

1. die prägonadale Etappe
2. die Oogenese und Präspermatogenese
3. Follikulogenese und Spermatogenese

Die prägonadale Etappe ist durch die Vermehrung und Entwicklung der primordialen Geschlechtszellen (Urgeschlechtszellen) gekennzeichnet, die innerhalb des extra- und intraembryonalen Entoderms im Bereich der Allantois entstehen und in die entstehenden Gonadenanlagen wandern.

In der zweiten Etappe der Gametogenese, die in der weiblichen Gonade "Oogenese", in der männlichen Gonade "Präspermatogenese" genannt wird, gehen nach einer oder mehreren Teilungen "Gonien" hervor, die in der weiblichen Gonade "Oogonien", in der männlichen "M-Prospermatogonien" (multiplying prospermatogonia) genannt werden. Durch Teilung entstehen aus der letzten Oogoniengeneration Oocyten, aus der letzten M-Prospermatogoniengeneration T_1-Prospermatogonien (primary transitional prospermatogonia, Hilscher et al. 1974). Bevor die Oocyten das stabile Dictyotänstadium (Ruhestadium) erreichen, durchlaufen sie die verschiedenen Stadien der meiotischen Prophase. Damit endet die Oogenese, und die Follikulogenese beginnt. Die T_1-Prospermatogonien hingegen verbleiben im "Gonienstadium" und treten erst später in die Mitose. Aus ihnen entstehen die T_2-Prospermatogonien (secondary transitional prospermatogonia), womit die Präspermatogenese endet.

Durch Teilung der T_2-Prospermatogonien entstehen A-Spermatogonien, welche die erste Zellpopulation der dritten Etappe, der Spermatogenese, darstellen.

Aus diesen gehen dann sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Spermatogonien hervor. In der Follikulogenese dagegen verbleiben die Oocyten bis zum Follikelsprung im Dictyotänstadium und durchlaufen dann rasch die beiden Reifeteilungen.

Ziel der vorliegenden histologischen Untersuchung war es, durch Synchronisation der T_1-Prospermatogonien Aufschlüsse über die Kinetik der nachfolgenden Tochterzellpopulationen zu gewinnen.

Vor dem 17. Fetaltag werden die Geschlechtszellen in den Keimsträngen durch die verschiedenen hintereinandergeschalteten Generationen der M-Prospermatogonien repräsentiert. Aus den M-Prospermatogonien gehen durch mitotische Teilung die T_1-Prospermatogonien hervor, die vom 19. Fetaltag bis zum 4. Tag p.n., das Gros der Geschlechtszellen bzw. die alleinige Geschlechtszellkategorie darstellen. Um den 5. Tag p.n. treten die T_1-Prospermatogonien aus der G_1-Phase in die S-Phase. Die Dauer der S-Phase (DNA Synthesedauer) wird mit 11,5 Stunden angegeben (Hilscher et al. 1974). Um möglichst alle T_1-Prospermatogonien in der G_1-Phase zu erfassen, wurde den Versuchstieren am Tage 4 p.n. + 6 h eine einmalige i.p. Gabe von Amethopterin (Methotrexat Lederle) zur Synchronisation injiziert. Die Dosierung von o,2 /u g/g Ratte erwies sich dabei als günstig (F.C. Ferguson, JR., J.B. Thiersch and F.S. Philips 1949).

Amethopterin (Methotrexat Lederle) gehört zur Stoffgruppe der Antimetaboliten, die Abwandlungsprodukte natürlicher Stoffe darstellen. Durch höhere Affinität zu Enzymen des Nukleinsäurenbasenstoffwechsels verdrängen sie die natürlichen Substrate und hemmen die Biosynthese der Nukleinsäurebasen. Amethopterin hemmt kompetitiv das Enzym Dihydrofolat-Reduktase, das Dihydrofolsäure (FH_2) zu Tetrahydrofolsäure (FH_4) reduziert. Die Folsäurederivate spielen

eine wichtige Rolle als Co-Substrat bei C_1-Einheiten Transport und sind an der Biosynthese von Thymidin, Purinbasen und Aminosäuren beteiligt. Da Methotrexat eine 1oo ooo-fach größere Affinität zur Dihydrofolat-Reduktase besitzt als die physiologisch vorliegende Dihydrofolsäure, muß die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase als praktisch irreversibel angesehen werden (Werkheiser W.C. 1963). Um die Nukleinsäurebasensynthese wieder zu ermöglichen, wird den Versuchstieren 5-Formyl-tetrahydrofolsäure (Leukovorin Lederle) als Antidot injiziert.

Material und Methodik

Als Versuchstiere dienten 3-6 Tage alte Albinoratten (Wistar-WU, Randomstamm Ivanovas), die auf folgende Weise herangezüchtet wurden:

Eine männliche, 3-4 Monate alte Ratte wurde zur Paarung über Nacht in einen Käfig mit 4-6 gleichaltrigen Weibchen gesetzt. Nach ca. 16 Stunden wurden die weiblichen Ratten von der männlichen getrennt, gekennzeichnet und gewogen. Als trächtig wurden die Ratten angesehen, die nach 14 Tagen einen Gewichtszuwachs von mindestens 3o g zeigten. Diese wurden in Einzelkäfige gesetzt. Zur Bestimmung des genauen Wurftermines wurden die Tiere am 23. Trächtigkeitstag in kurzen Zeitabständen kontrolliert, da nur solche Tiere zur Auswertung kamen, die genau am 23. Tag geworfen wurden.

Am 4. Tag p.n. + 6 h erhielten die männlichen Tiere eine einmalige i.p. Gabe von o,2 µg/g Methotrexat, 4 Stunden später eine einmalige i.p. Gabe o,32 mg Leukovorin. Nach verschiedenen Zeitintervallen erfolgte die Tötung der Tiere in tiefer Aethernarkose, die Entnahme der Gonaden und deren Fixierung in Bouinscher Lösung, in der diese 24 Stunden lang fixiert wurden. Nach Dehydration über die aufsteigende Alkoholreihe (7o,9o und 1oo%) und Aceton wurden die Gonaden in Paraplast gebracht und in Serie geschnitten. Dann erfolgte die Färbung der 5 µ dicken Schnitte durch Hämalaun und Eosin.

Pro Tier wurden 1ooo Geschlechtszellen ausgezählt, die in T_1-Prospermatogonien, T_2-Prospermatogonien, T_1-Mitosen, T_2-Mitosen, degenerierte T_1-Prospermatogonien, degenerierte T_2-Prospermatogonien und A-Spermatogonien differenziert wurden. Zur Vermeidung von Mehrfachzählungen wurde nur jeder 4. Schnitt und von diesem nur die äußeren, der Tunica albuginea anliegenden, runden Kanälchen ausgewertet.

Ergebnisse

Folgende morphologischen Kriterien wurden zur Differenzierung der jeweiligen Zellkategorien zugrunde gelegt:

T_1-Prospermatogonien: Die meist im Zentrum der Kanälchen gelegenen T_1-Prospermatogonien imponieren als große Zellen mit einem großen, von einer schwachen Kernmembran umgebenen Kern, die mehrere von hellen Höfen umsäumte runde Nukleolen enthalten.

T_2-Prospermatogonien: Im Gegensatz zu den T_1-Prospermatogonien liegen die T_2-Prospermatogonien zumeist in der Peripherie der Kanälchen, haben kleinere Kerne und keine hellen Höfe um ihre Nukleolen.

Degenerierte T_1- und T_2-Prospermatogonien: Die degenerierten T_1- und T_2-Prospermatogonien sind durch pathologisch aufgetriebene und verformte Kerne, sowie eine Vergrößerung der Nukleolenfläche gekennzeichnet.

Mitosen der T_1-Prospermatogonien: Die Mitosen der T_1-Prospermatogonien sind auffallend groß; die Chromosomen imponieren als lange dünne Fäden.

Mitosen der T_2-Prospermatogonien: Die Mitosen der T_2-Prospermatogonien unterscheiden sich von denen der T_1-Prospermatogonien dadurch, daß sie etwas kleiner sind und etwas dickere Chromosomen besitzen und somit plumper wirken.

A-Spermatogonien: Unter dieser Bezeichnung werden drei meist der Basalmembran anliegende Zelltypen zusammengefaßt:
1) Zellen mit ovalem Kern, gleichmäßig verteiltem Chromatin, kräftiger Kernmembran und drei bis vier prominenten Nukleolen,
2) Zellen mit ovalem Kern, staubförmig verteiltem Chromatin, zarter Kernmembran und mit an diese angelagerten regelmäßig geformten Nukleolen,
3) Zellen mit ovalem Kern, unregelmäßig verteiltem Chromatin und kräftiger Kernmembran, an die häufig Heterochromatin angelagert ist, sowie unauffälligen Nukleolen.

In den Tabellen 1-3 sind in Spalte 1 die Tötungstermine, in den Spalten 2-8 der Reihenfolge nach T_1-PSG, T_2-PSG, T_1- und T_2-Mitosen, degenerierte T_1- und T_2-PSG und A-Spermatogonien aufgeführt. Die Tabelle 1 enthält die Werte für die Kontrolltiere, die Tabelle 2 die Werte für die mit MTX und Leukovorin behandelten Versuchstiere. Tabelle 3 enthält den Vergleich zwischen den in den Tabellen 1 und 2 angegebenen Daten der Mittelwerte von den Kontrolltieren und den mit MTX und Leukovorin behandelten Versuchstieren.

Tabelle 1 macht deutlich, daß bis zum Tage 5 p.n. + 1o h (Zeile 6) die Mehrzahl der Prospermatogonien aus T_1-PSG besteht. Die Anzahl der Mitosen (Spalten 4 und 5) und der degenerierten Prospermatogonien (Spalten 6 und 7) ist gering. A-Spermatogonien treten nicht auf. Am 6. Tag p.n. (Zeile 7 und 8) zeigt sich, daß die Anzahl der T_1-PSG (Spalte 2) gesunken ist und die Anzahl der T_2-PSG zugenommen hat (Spalte 3). Die Mehrzahl der T_1-PSG muß zwischen dem Tage 5 p.n. + 1o h und dem Tage 6 p.n. in Mitose getreten sein. Dieses zeigt sich auch im sprunghaften Anstieg der Mitose-Indices.

Bemerkenswert ist, daß nicht nur die Mitose-Indices der T_1-sondern auch der T_2-PSG zugenommen hat (Spalten 4 und 5, Zeilen 6 und 7). Ein Anstieg der Zahl der degenerierten T_1- und T_2-PSG zeigt sich in den Spalten 6 und 7 in den Zeilen 7 und 8. Am Tage 6 p.n. treten zum ersten Mal A-Spermatogonien auf (Spalte 8, Zeilen 7 und 8).

Tabelle 2 zeigt in den Spalten 2 und 3, daß die Anzahl der T_1-PSG bis zum Tage 5 p.n. + 1 h (Zeile 9) in den behandelten Tieren größer ist als die der T_2-PSG (Versuchstier Zeile 4 ausgenommen). Ab dem Tage 5 p.n. + 3 h (Zeile 1o) bilden die T_2-PSG das Gros der Prospermatogonien. Aus Spalte 8 wird ersichtlich, daß die A-Spermatogonien bis zum Tage 5 p.n. + 1o h (Zeile 19) nicht nachweisbar sind. Am Tage 5 p.n. + 22 h (Zeile 2o) treten sie zum ersten Mal auf, und das gleich in großer Zahl.

Tabelle 3 gibt die Mittelwerte sowohl der Kontrolltiere als auch die der mit MTX und Leukovorin behandelten Versuchstiere wieder, indem die Werte der Kontrolltiere (Spalten 2, 4,6,8,1o,12 und 14) denen der mit MTX und Leukovorin behandelten Versuchstiere (Spalten 3,5,7,9,11,13 und 15) zum Vergleich vorangestellt werden.
Bis zum Tage 4 p.n. + 21 h (Zeile 3) bilden die T_1-PSG das Gros der Prospermatogonien sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den behandelten Versuchstieren (Spalten 2 bis 5). Am Tage 4 p.n. + 23 h (Zeile 4) zeigt sich eine Wende. Bei den Kontrolltieren stellen weiterhin die T_1-PSG die Mehrzahl der Prospermatogonien dar; die Mitoserate der T_1-PSG ist gering (Spalte 6). Die behandelten Versuchstiere zeigen einen starken Anstieg der T_2-PSG, die Anzahl der T_1-PSG sinkt. Die Mitoserate der T_1-PSG (Spalte 7) steigt sprunghaft an. Ein Vergleich der beiden Spalten 6 und 7, in denen die Mitoseraten der Kontrolltiere und der behandelten Tiere gegenübergestellt sind, zeigt deutlich, daß die Mitoserate der T_1-PSG der behandelten Versuchstiere als Folge der Synchronisation mit MTX stark erhöht ist (Zeile 4 bis 9). Dieses

trifft auch für die T_2-Mitosen zu (Spalte 8 und 9, Zeile 4 und 9).
Weiterhin fällt ein starker Anstieg der degenerierten T_1- und T_2-PSG bei den mit MTX und Leukovorin behandelten Versuchstieren auf (Spalte 11 und 13, Zeile 4 und 9).

Die in Tabelle 3 niedergelegten Ergebnisse sind in den Figuren 1-3 graphisch dargestellt.

Figur 1 zeigt die Anteile der identifizierten Geschlechtszelltypen zwischen den Tagen 4 und 6 p.n. in Promille. Die Ergebnisse der Kontrolltiere werden mit I, die der behandelten Versuchstiere mit II bezeichnet. Die "Fraktionen" der T_1- und T_2-PSG setzen sich zusammen aus den intakten Interphasen, den degenerierten Interphasen sowie den intakten und degenerierten Mitosen. Es zeigt sich, daß bei den Kontrolltieren die Promilleanteile der T_1- und T_2-PSG bis zum Tage 5 p.n. + 1o h gleich bleiben. Die T_1-PSG bilden das Gros der Geschlechtszellen. Am Tage 6 p.n. ist ihr Anteil gesunken, die Anzahl der T_2-PSG angestiegen. Bei den behandelten Versuchstieren erkennt man, daß sich bis zum Tage 4 p.n. + 21 h die Werte wie die der Kontrolltiere verhalten. Ab dem Tage 4 p.n. + 23 h sinkt die Anzahl der T_1-PSG und erreicht am Tage 6 p.n. ungefähr den Wert der Kontrolltiere. Die A-Spermatogonien treten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den behandelten Versuchstieren erst um den Tag 6 p.n. auf. Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die Anteile der Geschlechtszellen der Kontrolltiere kaum von denen der behandelten Versuchstiere.

Figur 2 zeigt die zeitlichen Verläufe der Kurven der Mittelwerte der Mitose-Indices der T_1-PSG und der T_2-PSG im untersuchten Zeitraum zwischen den Tagen 4 bis 6 p.n.. Die Mitosen der T_1-PSG werden durch runde, die der T_2-PSG durch dreieckige Symbole symbolisiert, wobei die Mitosen der Kontrolltiere mit ausgesparten, die Mitosen der behandelten Versuchstiere mit ausgefüllten Symbolen dargestellt werden. Bei den

Kontrolltieren zeigt der Kurvenverlauf der Mitosen der T_1-PSG einen stetigen Anstieg zwischen den Tagen 5 und 6 p.n.. Für die T_2-Mitosen ist keine Kurve erstellt, da vor dem Tage 6 p.n. bei den Kontrolltieren bis auf eine Ausnahme keine Mitosen auftreten. Erst am Tage 6 p.n. kommen T_2-Mitosen in großer Anzahl vor. Bei den behandelten Versuchstieren wird deutlich, daß der Kurvenverlauf für die T_1-Mitosen am Tage 4 p.n. + 23 h stark ansteigt, danach sein Maximum erreicht und bis zum Tage 6 p.n. stark abfällt. Die Kurve der T_2-Mitosen verläuft biphasisch, wobei das erste Maximum mit dem der T_1-Mitosen zeitlich zusammenfällt. Das zweite Maximum liegt um den Tag 6 p.n.

In Figur 3 sind die zeitlichen Verläufe der Summenkurven der Mitose-Indices bei den Kontrolltieren und den behandelten Versuchstieren dargestellt. Die ausgesparten Symbole kennzeichnen die Mitose-Indices der behandelten Versuchstiere, die ausgefüllten die der Kontrolltiere. Die Kurve für die Kontrolltiere zeigt einen geringen Anstieg bis zum Tage 5 p.n. + 12 h. Von diesem Zeitpunkt an wird ein rapider Anstieg bis zum Tage 6 p.n. deutlich. Für die behandelten Versuchstiere zeigt die Kurve einen steilen Anstieg vor dem Tage 5 p.n. und erreicht ein Maximum am Tage 5 p.n. + 3 h. Danach fällt die Kurve stark ab und steigt dann wieder stetig bis zum Tage 6 p.n. an.

Diskussion

Das Samenepithel der Nagetiere, besonders das der Ratte, ist so übersichtlich angeordnet, daß es ein ideales Objekt für Untersuchungen der Proliferation und ihrer Störungen darstellt. Schon von Ebner (1888) hatte in seiner Arbeit "Zur Spermatogenese bei den Säugethieren" die eigenartige Anordnung des Samenepithels der Ratte mit folgenden Worten beschrieben: "Diese Thatsache der räumlichen Aufeinanderfolge der zeitlichen Entwicklungsstadien weist darauf hin, daß im Verlaufe eines Samenkanälchens die Spermatogenese nach Art einer Welle abläuft, das heißt so, daß jeder dem Verlaufe eines Samenkanälchens angehörige Abschnitt um ein Zeitmoment später den selben Entwicklungsprozeß beginnt, wie der vorhergehende, so daß auf eine gewisse Strecke, welche man einer Wellenlänge vergleichen könnte, alle Entwicklungsphasen vertreten sind."

Wie Schema 1 zeigt, enthält das Samenkanälchen der adulten Ratte mehrere Keimzellschichten. Im quergeschnittenen Kanälchen besteht jede dieser Schichten aus einer annähernd synchronen Zellpopulation. Die Keimzelle wandert während ihrer Entwicklung allmählich von der Kanälchenmembran zur Lichtung. Alle Entwicklungsphasen, die sie während ihrer Wanderung von einer Schicht in die nächst höhere durchläuft, bilden zusammen einen "Cyklus".

Die Zeit, welche die Keimzelle benötigt, um von einer Keimzellschicht in die nächst höhere zu gelangen, wird "Cyklusdauer" genannt. Bei der Ratte beträgt die Cyklusdauer annähernd 13 Tage (Clermont und Harvey 1965, Hilscher 1964, Hilscher und Hilscher 1969, Huckins 1965), bei der Maus etwa 8,5 Tage (Oakberg 1956), beim Kaninchen etwa 1o,5 Tage (Amann, Koefoed-Johnson und Levi 1965, Orgebin-Christ 1965, Swierstra und Foote 1963), beim Schafsbock ebenfalls etwa 1o,5 Tage, beim Stier 13,5 Tage (Hochereau, Courot und Ortavant 1964, Ortavant 1954, 1956, 1958), beim Eber annähernd 8 Tage (Swierstra 1968) und beim Menschen etwa 16 Tage

(Heller und Clermont 1963).

Dadurch, daß die Cyklusdauer nahezu keinen biologischen Schwankungen unterliegt, sind immer die gleichen Entwicklungsstadien der einzelnen Schichten innerhalb eines Kanälchenquerschnittes miteinander assoziiert. Leblond und Clermont (1952) faßten ganz charakteristische Gruppierungen der einzelnen Keimzellschichten zu 14 Stadien zusammen, die in Schema 1 schematisch nebeneinander aufgetragen sind. Diese Stadieneinteilung basiert auf den einzelnen Entwicklungsschritten der Spermatiden während der Spermiogenese. Daher wurde das Stadium, in dem die nach der Reifeteilung entstandenen Spermatiden ihren höchst komplizierten Differenzierungsprozeß beginnen, als Stadium I bezeichnet. Die Spermiogenese endet mit der Ausschleusung der Spermatozoen in die Kanälchenlichtung in Stadium VIII. Da immer die gleichen Entwicklungsstadien der einzelnen Keimzellschichten innerhalb eines Kanälchenquerschnittes miteinander assoziiert sind, zeigen die aneinandergereihten Stadien I - XIV nicht nur die aufeinanderfolgenden Entwicklungsschritte der Spermatiden, sondern auch die einzelnen Entwicklungsschritte der Spermatogonien und Spermatocyten.

Mit dem vorliegenden Schema läßt sich zeigen, daß die Keimzellen vom Eintritt der A_1-Spermatogonien im Stadium IX bis zur Ausschleusung der Spermatozoen im Stadium VIII insgesamt 4 Schichten passieren. Sie benötigen hierfür 4 mal eine Cyklusdauer, i.e. etwa 52 Tage. Bei ihrer Wanderung zur Kanälchenlichtung durchlaufen die Keimzellen die gleichen Entwicklungsphasen, die in Längsrichtung nebeneinander angeordnet sind. Wegen dieses histotopographischen Verhaltens ist das längsgeschnittene Samenkanälchen der Ratte ein ideales Objekt, an dem man sämtliche Differenzierungsschritte während der Spermatogenese verfolgen kann: das rein statische histologische Bild vermittelt den Eindruck eines dynamischen Ablaufs. Die den Stadien entsprechenden Zellassoziationen im Längsverlauf des Samenkanälchens bezeichnet man nach Perey, Clermont und Leblond (1961) als "Segmente". Hilscher

(1980) schreibt über die Zellassoziationen: "Das Samenepithel der meisten Mammalia setzt sich aus mehreren aufeinanderfolgenden konzentrisch angeordneten Zellschichten zusammen. Neben dieser horizontalen Anordnung der aufeinanderfolgenden Zellschichten zeigt das Samenepithel eine vertikale, von der Basalmembran zur Kanälchenlichtung orientierte Gliederung in Form von Zellassoziationen. Eine Zellassoziation ist ein Gewebsverband, der dadurch gekennzeichnet ist, daß die Entwicklungsphasen, in denen sich die Geschlechtszellen befinden, genau aufeinander abgestimmt sind. Da das Samenepithel von 4 bzw. 5 aufeinanderfolgenden Schichten gebildet wird, setzt sich auch eine Zellassoziation aus 4 bzw. 5 Schichten von Geschlechtszellen zusammen. Diese befinden sich jeweils in einer ganz bestimmten Entwicklungsphase und sind in der Vertikalen so miteinander assoziiert, daß sie stets nur in dieser einen Kombination vorkommen, das heißt, daß sie ein in den Samenkanälchen immer wieder auftretendes, stets gleichbleibendes Phasenmuster der Geschlechtszellen bilden."

Die vorliegende Pilotstudie beschäftigte sich nun mit der Frage, ob es möglich sei, den Aufbau des Samenepithels der Ratte zu verändern. Da Hilscher et al. (1972) diskutierten, daß der "wellenförmige" Aufbau des Samenepithels eventuell schon zu einer sehr frühen Phase in der männlichen Gametogenese festgelegt sei, nämlich zu dem Zeitpunkt, da die eigentliche Spermatogenese einsetzt, schien es sinnvoll, zu versuchen, die T_1-Prospermatogonien zu synchronisieren. Möglicherweise, so lautete die Arbeitshypothese, könnte dabei eine Veränderung im Aufbau des Samenepithels eingeleitet werden.

Wie aus den Figuren 2 und 3 zu ersehen ist, scheint die vorliegende Versuchsanordnung zunächst einen Synchronisationseffekt zur Folge zu haben: Der prozentuale Anteil der Geschlechtszellmitosen nimmt im Vergleich zur Norm zu. Diese Zunahme ist jedoch nicht kontinuierlich. Deutlich lassen sich zwei Peaks bzw. Kurvenmaxima erkennen, von denen der erste um den Tag 5 p.n. zur Hauptsache von T_1-Prospermatogonien gebildet wird, der zweite, am Tag 6 p.n. von T_2-Prospermatogonien. In diesem Zusammenhang muß hervorgehoben werden, daß, wie in Fig. 2 zu erkennen ist, auch Mitosen von T_2-Prospermatogonien an dem generellen Anstieg der Mitosen um den Tag 5 p.n. beteiligt sind.
Das bedeutet, daß bereits am Tag 4 p.n. + 6 h, dem Beginn des Versuchs, T_2-Prospermatogonien vorhanden sein müssen, wie dies ja auch aus Fig. 1 hervorgeht. Die starke Zunahme der T_2-Prospermatogonien in Interphase ist Folge des ersten Peaks von T_1-Prospermatogonienmitosen und somit gleichfalls als Synchronisationseffekt zu deuten.

Trotz dieses Anstiegs des prozentualen Anteils der T_1- und T_2-Mitosen an der Gesamtgeschlechtszellpopulation (Fig.2) bzw. an den jeweils zugehörigen Geschlechtszelltypen (Fig.1) kommt es aber nicht zu einer (bleibenden) Synchronisation: Am Tag 6 p.n. unterscheiden sich die Relationen der einzelnen Geschlechtszelltypen von Versuchstieren und Kontrolltieren nicht. Eigentlich wäre ein höherer Anteil an A-Spermatogonien zu erwarten gewesen. Daß dieses nicht eingetreten ist, läßt sich durch eine Degeneration der T_2-Prospermatogonien, aus denen die A-Spermatogonien entstehen, erklären. In der Tat wurden relativ mehr degenerierte T_2-Prospermatogonien bei den behandelten Tieren als bei den Kontrolltieren gefunden (Tab. 3, Spalte 12 und 13). Der Synchronisationseffekt wird also durch eine hohe Degenerationsrate wieder aufgehoben.

Gleichsam als "Nebenbefund" kommen bei den Tieren der Versuchsgruppe Riesenzellen von T_2-Prospermatogonien vor. Dieser

Befund ist neben dem vermehrten Vorkommen von degenerierten Interphasenkernen und vor allem Mitosefiguren ein Zeichen dafür, daß die MTX und möglicherweise auch die Leukovorinbehandlung zu einer Schädigung der Geschlechtszellen geführt hat. Bei den Kontrolltieren konnten solche Riesenzellen nicht gefunden werden. Wichtiger ist jedoch der Umstand, daß das Vorkommen von Riesenzellen der T_2-Prospermatogonien darauf hinweist, daß dieser Zelltyp offensichtlich keine Degenerationsform der T_1-Prospermatogonien darstellt, wie es Hilscher (1980) immerhin für möglich gehalten hat, sondern eine selbständige Zellkategorie. Durch das Cytostatikum Myleran hervorgerufene Riesenzellen von T_1-Prospermatogonien (Hilscher et al. 1972) sehen ganz anders aus. Ihre Kerne sind wesentlich größer.

Die Entstehung der Riesenzellen muß kurz nach dem Ablauf der Mitose der T_1-Prospermatogonien stattfinden: Neben Riesenzellen finden sich - häufiger als bei den Kontrolltieren - sehr dicht stehende Kerne von T_2-Prospermatogonien (Abb. 1 und 2). Sie erweisen sich mithin einwandfrei als eben entstandene "postmitotische" bzw. "frühe" Zellen, d.h. als Tochterzellen der T_1-Prospermatogonien. Fotographische Aufnahmen (Abb. 3-16 von Allhoff et al., 1975) zeigen, wie die Tochterzellen der T_1-Prospermatogonien in der Regel entstehen. Offensichtlich separieren sich bei den Versuchstieren die "frühen" T_2-Prospermatogonien nicht, wie dies normalerweise der Fall ist und konfluieren (Abb. 3). Ob dieser Prozeß der Konfluenz durch das Vorhandensein von Interzellularbrücken begünstigt wird, wie das bei geschädigten Spermatogonien, Spermatocyten und Spermatiden des adulten Individiums der Fall ist, ist noch nicht geklärt, aber sehr wahrscheinlich.

Der niedrige Kurvenverlauf der Mitose-Indices bei den Kontrolltieren (Fig. 2 und 3) stimmt mit dem Säulendiagramm von Fig. 1 überein, das für alle Kontrolltiere bis zum Tag 5 p.n. + 1o h fast ausschließlich T_1-Prospermatogonien ausweist. Als mögliche Erklärung könnte eine Retardierung der

Kontrolltiere in ihrer Geschlechtszellentwicklung gegenüber den Tieren der Versuchsgruppe angenommen werden. Es muß ferner darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den Zahlenangaben nicht auf Relationen "Geschlechtszellen pro 1ooo Tubulusquerschnitte" sondern jeweils bezogen auf 1ooo Geschlechtszellen handelt. Das könnte zu einer scheinbaren Erhöhung des Mitoseindex der Versuchstiere führen, wenn man annimmt, daß ein Teil der entstehenden T_2-Prospermatogonien die Mitose nicht übersteht und von den Sertolizellen phagocytiert wird.

Die eingangs gestellte Frage, ob sich mit der in der vorliegenden Pilotstudie angewandten Methode der "wellenförmige Charakter" im Aufbau des Samenepithels verhindern läßt bzw. ob sich überhaupt eine Modifikation im Aufbau des Samenepithels im Vergleich zur Norm erreichen läßt, erscheint nach den Ergebnissen dieser Pilotstudie mehr als zweifelhaft. Mit der angewandten Methode konnte nachgewiesen werden, daß T_1- und T_2-Prospermatogonien durch MTX in ihrer Kinetik blockiert werden und daß Leukovorin diese Blockade aufhebt.

Zusammenfassung

Männliche Jungratten erhielten am 4. Tag p.n. + 6 h eine einmalige i.p. Gabe von o,2 µg/g Methotrexat und vier Stunden später eine einmalige i.p. Gabe von o,32 mg Leukovorin. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Versuchstiere getötet. Pro Tier wurden 1ooo Geschlechtszellen ausgezählt und untergliedert in T_1- und T_2-Prospermatogonien, Interphasen und Mitosen sowie degenerierte T_1- und T_2-Prospermatogonien und A-Spermatogonien. Die Ergebnisse der Auswertungen von Versuchstieren und Kontrolltieren wurden verglichen.

Die Auswertungen ergaben, daß in Folge der Synchronisation der T_1-Prospermatogonien der prozentuale Anteil der Geschlechtszellmitosen im Vergleich zur Norm zunahm. Der Kurvenverlauf der Mitose-Indices ließ deutlich zwei Peaks erkennen, von denen der erste hauptsächlich von den T_1-Prospermatogonien um den 5. Tag p.n., der zweite von den T_2-Prospermatogonien um den 6. Tag p.n. gebildet wurde.
Eine Gegenüberstellung der prozentualen Anteile der Geschlechtszellpopulationen der Versuchstiere und der Kontrolltiere am 6. Tag p.n. ergab keine Unterschiede. Dies zeigte, daß die Synchronisation der Geschlechtszellen zu diesem Zeitpunkt wieder aufgehoben war. Es kam somit nur zu einer passageren, nicht aber zu einer bleibenden Synchronisation.

Ferner fielen bei den Tieren der Versuchsgruppe Riesenzellen von T_2-Prospermatogonien und ein vermehrtes Vorkommen von degenerierten Interphasenkernen und Mitosefiguren auf. Diese Befunde sprachen für eine Zellschädigung durch Methotrexat und möglicherweise auch durch Leukovorin. Das Auftreten von Riesenzellen der T_2-Prospermatogonien zeigte deutlich, daß dieser Zelltyp keine Degenerationsform der T_1-Prospermatogonien darstellt, sondern eine selbständige Zellkategorie.

Literatur

Allhoff, E., Heinrichs, J., Nitsiota, E., Seeberg-Elverfeldt, A.: Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der männlichen Geschlechtszellen zu Beginn der "Frühenspermatogenese". Untersuchungen an Wistarratten.(1975)

Amann, R.P., Koefoed-Johnson, H.H. and Levi, H.: Excretion pattern of labeled spermatozoa and timing of spermatozoa formation and epididymal transit in rabbits injected with thymidine-^{3}H.
J.Reprod.Fertility 1o, 169183 (1965)

Clermont, Y., Harvey, S.C.: Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats.
Endocrinology 76, 8o-8o (1965)

Ebner, V. von: Zur Spermatogenese bei den Säugethieren.
Arch.Mikroskop.Anat.Entwicklungsgesch. 31, 236-292 (1888)

Ferguson, F.C.,JR., Thiersch, J.B. and Philips, F.S.: The Action of 4-Amino-N^{1o}-Methyl-Pteroylglutamic Acid in Mice, Rats and Dogs.
J.Pharm.Exper.Therapeutics 98, 293 (195o)

Heller, C.G. and Clermont, Y.: Spermatogenesis in man: an estimate of its duration.
Science 14o, 184-186 (1963)

Hilscher, W.: Beiträge zur Orthologie und Pathologie der "Spermatogoniogenese" der Ratte.
Beitr.Pathol.Anat. 13o, 69-132 (1964)

Hilscher, W. und Hilscher, B.: Autoradiographische Untersuchungen über die Kinetik der Spermatogenese der Wistarratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermatocytogenese.
Zschr.Zellforsch. 96, 625-64o (1969)

Hilscher, W., Hilscher, B., Gauss, G., Lippers, P. und Bülthoff, B.: Untersuchungen zur Kinetik der Gonocyten und Stützzellen der Wistarratte unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Andrologie 4 (4), 311-325 (1972)

Hilscher, W.: Zur Spermatogenese des Menschen.
Therapiewoche 3o, 214-236 (198o)

Hilscher, W., Hilscher, B.: Kinetics of the male gametogenesis.
Andrologia 8, 1o5-116 (1976)

Hochereau, M.T., Courot, M. et Ortavant, R.: Durée de la spermatogénese chez le taureau; étude par autoradiographie testiculaire.
Proc.5th Intern.Congr.Animal Reprod., Trento, 1964, 3, 541-546 (1964)

Hochereau, M.T., Courot, M. and Ortavant, R.: Marquage des cellules germinales du bélier et du taureau par injektion des thymidine tritiée dans l'artére spermatique.
Ann.Biol.Animale Biochem.Biophys. 2, 157-161 (1964)

Huckins, C.: Duration of spermatogenesis in pre- and post-puberal Wistar rats (Abstr.)
Anat.Record 151, 364 (1965)

Leblond, C.P. and Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 55, 548-573 (1952)

Oakberg, E.F.: Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium.
AmJ.Anat. 99, 5o7-516 (1956)

Orgebin-Christ, M.C.: Passage of spermatozoa labeled with thymidine-^{3}H through the ductus epididymidis of the rabbit.
J.Reprod.Fertility 1o, 241-251 (1965)

Ortavant, R.: Contribution á de la durée du processus spermatogénétique du bélier á l'aide du p^{22}.
Compt.Rend.Soc.Biol. 148, 8o4-8o6 (1954)

Ortavant, R.: Autoradiographie des cellules germinales du testicule de bélier. Durée des phénoménes spermatogénétiques.
Arch.Anat.Microscop.Morphol.Expl. 45, 1-1o (1956)

Ortavant, R.: Le cycle spermatogénétique chez le bélier (Thesis).
Paris (1958)

Perey, B., Clermont, Y. and Leblond, C.P.: The wave of the seminiferous epithelium in the rat.
Am.J.Anat. 1o8, 44-47 (1961)

Swierstra, N.E. and Heller, C.G.: Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar. Duration of spermatozoon transit through the epididymis.
Anat.Record 161, 171-186 (1968)

Swierstra, N.E. and Foote, R.H.: Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit.
J.Reprod.Fertility 5, 3o9-322 (1963)

Werkheiser, W.C.: The Biochemical, Cellular and Pharmacological Action and Effects of the Folic Acid Antagonists.
Cancer Res. 23, 1277-1285 (1963)

		Prospermatogonien		Mitosen				
	Tötungstermin	T_1	T_2	T_1	T_2	deg.T_1	deg.T_2	A-Sperm.
1	4 d + 6 h	914,66	66,16	1,92	Ø	17,26	Ø	Ø
2	4 d + 6 h	659,87	311,16	16,o9	2,15	4,29	6,44	Ø
3	4 d + 1o h	861,19	129,o9	1,77	Ø	7,o7	o,88	Ø
4	4 d + 23 h	794,73	196,8o	Ø	Ø	5,65	2,82	Ø
5	4 d + 23 h	777,55	2o3,91	5,15	Ø	9,27	4,12	Ø
6	5 d + 1o h	856,28	129,55	5,o6	Ø	4,o5	5,o6	Ø
7	6 d	1o2,64	419,55	15,64	35,19	16,62	62,56	347,8o
8	6 d	98,73	342,14	14,66	5o,83	23,46	65,49	4o4,69
	1	2	3	4	5	6	7	8

Tab. 1: Kontrolltiere

Tab. 2: mit MTX und Leukovorin behandelte Versuchstiere

		Prospermatogonien		Mitosen				
	Tötungstermin	T_1	T_2	T_1	T_2	deg.T_1	deg.T_2	A-Sperm.
1	4 d + 21 h	7o3,97	23o,69	8,91	4,95	28,71	22,77	Ø
2	4 d + 21 h	836,35	147,59	Ø	2,o1	11,o4	3,o1	Ø
3	4 d + 23 h	251,52	654,81	64,18	3,47	8,67	17,35	Ø
4	4 d + 23 h	469,2o	495,48	25,36	Ø	3,62	6,34	Ø
5	4 d + 23 h	587,17	393,68	6,7o	Ø	8,62	3,83	Ø
6	4 d + 23 h	62o,o6	316,3o	44,36	Ø	11,57	7,71	Ø
7	4 d + 23 h	482,52	4o6,47	28,85	17,48	34,o9	3o,59	Ø
8	4 d + 23 h	483,92	459,19	2o,61	1o,72	7,42	18,14	Ø
9	5 d + 1 h	473,44	444,44	34,78	11,59	27,o5	8,7o	Ø
1o	5 d + 3 h	29o,61	573,38	59,69	3o,33	8,81	37,18	Ø
11	5 d + 5 h	443,16	455,59	38,19	15,1o	19,54	28,42	Ø
12	5 d + 6 h	25o,98	699,22	9o,27	4,88	9,77	4,88	Ø
13	5 d + 1o h	338,89	617,59	27,78	2,78	4,63	8,33	Ø
14	5 d + 1o h	232,4o	715,53	4o,5o	1,93	4,82	4,82	Ø
15	5 d + 1o h	26o,87	7o2,12	23,13	1,85	8,33	3,7o	Ø
16	5 d + 1o h	337,94	61o,2o	31,98	7,78	6,o5	6,o5	Ø
17	5 d + 1o h	.64,38	834,9o	6o,23	19,73	1o,38	1o,38	Ø
18	5 d + 1o h	281,81	573,98	31,1o	21,68	4o,53	5o,9o	Ø
19	5 d + 1o h	316,o8	549,73	26,65	25,74	2o,22	61,58	Ø
2o	5 d + 22 h	1o2,18	461,31	1o,91	75,4o	32,74	1o2,18	215,28
21	5 d + 22 h	43,48	437,68	5,8o	85,o2	1o,63	53,14	364,25
22	6 d	42,o2	417,37	14,33	74,45	19,1o	88,83	342,88
	1	2	3	4	5	6	7	8

	Tötungst.	T_1		T_2		T_1-Mitose		T_2-Mitose		deg.T_1		deg.T_2		A-Sperm.	
		K	MTX	K	MTX	K	MTX	K	MTX	K	MTX	K	MTX	K	MTX
1	4 d + 6 h	787,25		188,66		9,o1		1,o8		1o,78		3,22		ø	
2	4 d + 1o h	861,19		129,o9		1,77		ø		7,o7		o,88		ø	
3	4 d + 21 h		77o,15		189,14		4,46		3,48		19,88		12,89		ø
4	4 d + 23 h	786,13	482,4o	2oo,36	454,32	2,58	31,68	ø	5,28	7,46	12,33	3,47	13,99	ø	ø
5	5 d + 1 h		473,44		444,44		34,78		11,59		27,o5		8,7o		ø
6	5 d + 3 h		29o,61		573,38		59,69		3o,33		8,81		37,18		ø
7	5 d + 5 h		443,16		455,59		38,19		15,1o		19,54		28,42		ø
8	5 d + 6 h		25o,98		699,22		3o,27		4,88		9,77		4,88		ø
9	5 d + 1o h	856,28	261,77	129,55	657,72	5,o6	34,48	ø	11,64	4,o5	13,57	5,o6	2o,82	ø	ø
1o	5 d + 22 h		72,83		449,5o		8,36		8o,21		21,69		77,66		289,77
11	6 d	1oo,69	42,o2	38o,83	417,37	15,15	14,33	43,o1	75,45	2o,o4	19,1o	64,o3	88,83	376,25	342,88
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11	12	13	14	15

Tab. 3: Kontrolltiere und behandelte Versuchstiere (Mittelwerte)

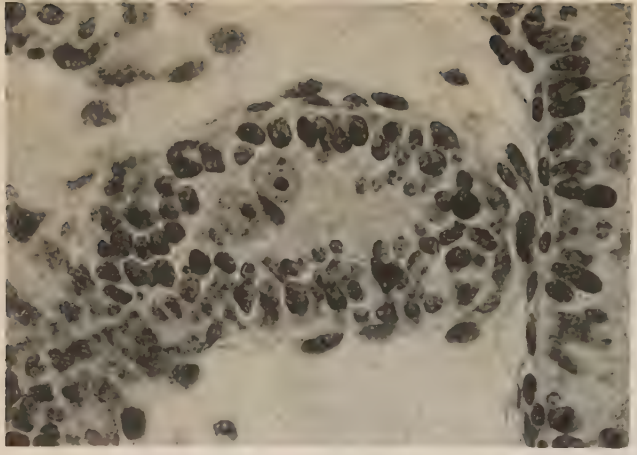

Abb. 1

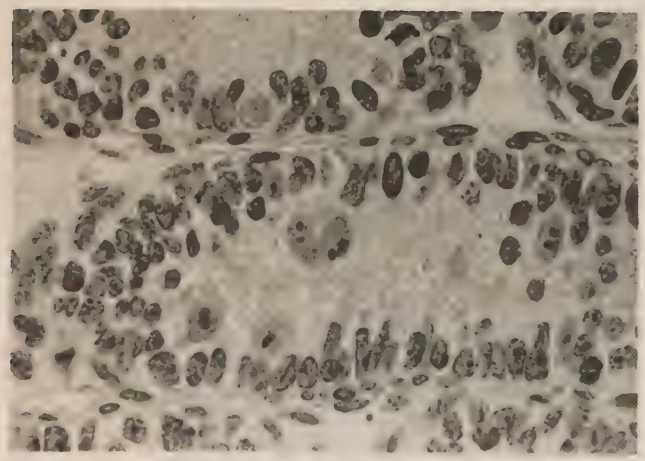

Abb. 2

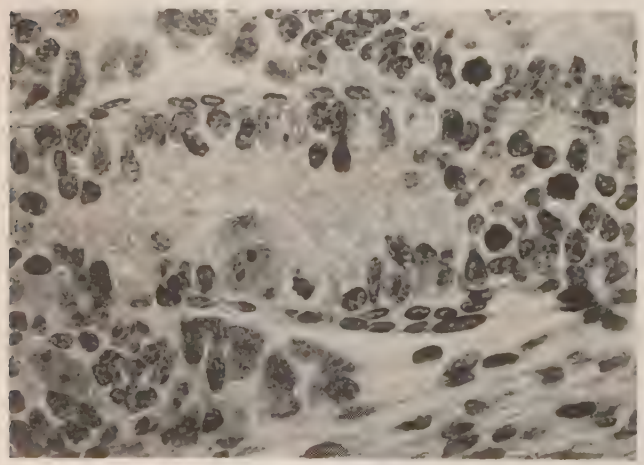

Abb. 3

Abb. 1
Zwei T_2-Prospermatogonien, die durch eine Stützzelle getrennt sind, in einem schräg angeschnittenen Keimstrang.
Obj.: 25 x; Färbung: Hämalaun-Eosin

Abb. 2
Zwei dicht stehende T_2-Prospermatogonien in einem längs getroffenen Keimstrang.
Obj.: 25 x; Färbung: Hämalaun-Eosin

Abb. 3
T_2-Prospermatogonien-Riesenzelle mit konfluierten, verformten Kernen in einem längs angeschnittenen Keimstrang.
Obj.: 25 x; Färbung: Hämalaun-Eosin

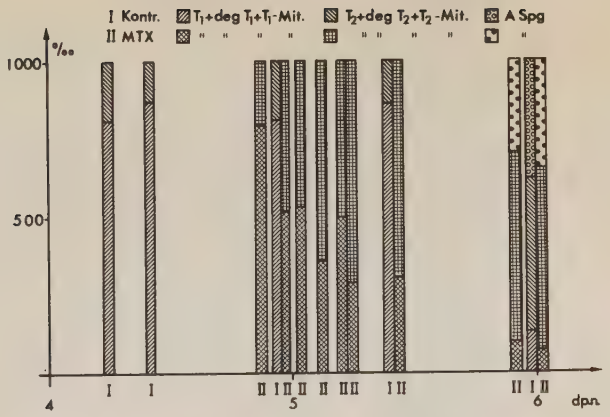

Fig. 1

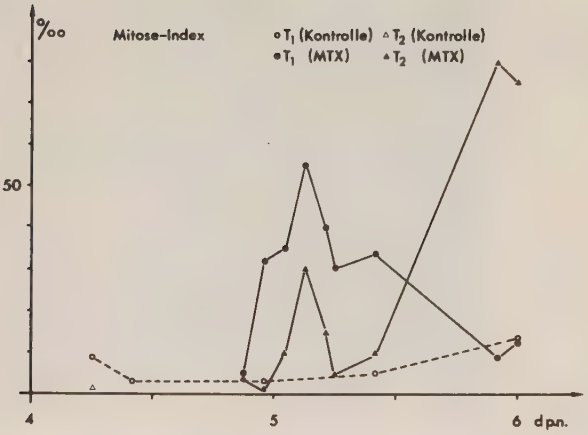

Fig. 2

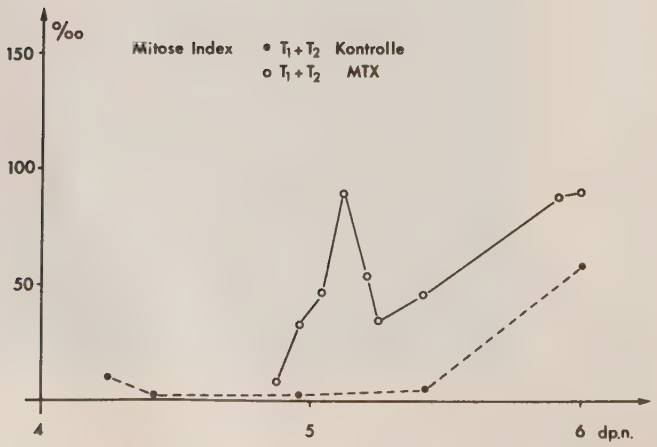

Fig. 3

Fig. 1
Säulendiagramm der Häufigkeitsverteilung von T_1-, degenerierten T_1-Prospermatogonien und T_1-Mitosen und T_2-, degenerierten T_2-Prospermatogonien, T_2-Mitosen und A-Spermatogonien zwischen den Tagen 4 p.n. + 6 h und 6 p.n. bei Kontrolltieren (I) und Versuchstieren (II).

Fig. 2
Mitose-Index der Kontrolltiere (ausgesparte Symbole) und der Versuchstiere (ausgefüllte Symbole) zwischen den Tagen 4 p.n. + 6 h und 6 p.n. getrennt nach T_1- und T_2-Mitosen.

Fig. 3
Summenkurve der Mitose-Indices der T_1- und T_2-Prospermatogonien bei Kontrolltieren (ausgefüllte Symbole) und Versuchstieren (ausgesparte Symbole) zwischen den Tagen 4 p.n. + 6 h und 6 p.n.

Schema 1

Lebenslauf

27.04.1949	als Sohn des Werkzeugmachers Hans Schaumburg und seiner Ehefrau Käthe, geb. Scheufler, in Wuppertal geboren.
1956 - 1960	Besuch der Volksschule in Wuppertal.
1960 - 1969	Besuch des Staatlichen Gymnasiums Bayreuther Str. in Wuppertal
11.06.1969	Abitur
1969 - 1972	Apothekerpraktikant in der Sedan-Apotheke, Wuppertal; Abschluß: Pharmazeutisches Vorexamen.
1972 - 1974	Tätigkeit im erlernten Beruf.
seit WS 1974	immatrikuliert an der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
März 1977	Physikum in Düsseldorf
März 1978	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1980	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Hansgünter Schaumburg

Herrn Professor Dr. H.W. Schlipköter gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. W. Hilscher danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas, die tatkräftige Unterstützung und seine wertvollen Anregungen und Ratschläge.

Ebenfalls möchte ich Frau B. Hilscher für ihre hilfreiche Unterstützung besonders danken.

Frau Rehbein danke ich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Versuche.